Riv Med Lab - JLM, Vol. 2, S.1, 2001

Guida alla diagnostica di laboratorio dell'infertilità maschile

A. A. Sinisi, D. Pasquali, D. Esposito, A. Notaro, A. Bellastella
Endocrinologia, Dipartimento Medicina Internistica e Sperimentale, Seconda Università, Napoli

Introduzione

L'aumento delle conoscenze della fisiologia della riproduzione maschile e dei meccanismi della fecondazione insieme all'avvento di tecniche di fertilizzazione *in vitro* sempre più efficaci, come la ICSI, capaci di offrire una possibilità di cura a condizioni finora ritenute non trattabili, hanno portato ad un profondo cambiamento nella gestione dell'infertilità maschile rispetto alla pratica tradizionale. L'iter diagnostico moderno deve articolarsi in maniera da arrivare ad un corretto inquadramento eziologico della patologia maschile e alla scelta di un trattamento efficace, evitando indagini inutili e dispendiose (1). Una coppia si può definire infertile se non ha una gravidanza dopo un anno di rapporti non protetti. In circa il 15 % delle coppie che hanno rapporti non protetti non si ha una gravidanza nel corso del primo anno ed in circa il 5% alla fine del secondo anno. Pertanto, le indagini di base vanno eseguite dopo almeno un anno di infertilità, mentre quelle più costose ed invasive vanno avviate dopo 2 o più anni. È importane ricordare che il problema può derivare da una combinazione di fattori provenienti da entrambi i componenti della coppia, per cui è necessario sempre tenere conto del potenziale di fertilità della partner femminile, che andrebbe valutato contemporaneamente.
Un corretto inquadramento clinico, con una raccolta dettagliata della storia medica e sessuale della coppia e un esame clinico completo, dovrebbe precedere l'avvio delle analisi di laboratorio e della diagnostica strumentale. Noi in questa breve messa a punto ci occuperemo dei test di laboratorio, che possono essere di *livello iniziale*, utili cioè a definire il potenziale riproduttivo maschile, *di secondo livello*, mirati ad identificare specifiche condizioni patologiche ed orientare verso scelte terapeutiche razionali, e, infine, *quelli di livello avanzato*, o ultra-specialistico, utili per la diagnosi e la prognosi delle condizioni da sottoporre a tecniche di riproduzione assistita e, in particolare, alla ICSI.

Test diagnostici iniziali

Esame del liquido seminale
L'esame del liquido seminale (LS) o spermiogramma è il test di laboratorio più ampiamente utilizzato per la diagnosi dell'infertilità nel maschio e va eseguito sempre come primo esame nel *work-up* dell'infertilità di coppia. È bene sottolineare che i risultati di questo esame (numero, motilità e morfologia degli spermatozoi) sono misure indirette della funzione degli spermatozoi e non correlano direttamente con la capacità fecondante. Per la standardizzazione operativa e per rendere i risultati comparabili tra i vari laboratori, l'esame del LS deve essere praticato secondo le procedure raccomandate dall'organizzazione Mondiale della Sanità (WHO), che sono riportate nel *WHO laboratory manual for the examination of the human ejaculate and sperm-cervical mucus interaction* (2). Il manuale WHO indica i valori normali di riferimento e la nomenclatura da utilizzare nei referti (Tabb. I, II). I valori normali sono derivati dal confronto dei risultati trovati tra popolazione normale ed infertile, ma non sono predittivi della reale capacità fecondante, a meno che non ci sia una azoospermia. Tuttavia, utilizzando i dati offerti dall'esame del LS e le informazioni anamnestiche (durata dei tentativi di fecondazione, età e potenziale di fertilità della partner) si può stimare con maggiore approssimazione la probabilità di future gravidanze spontanee. Se i valori normali identificano quei pazienti che non dovrebbero avere difficoltà nell'indurre una gravidanza, i valori al di sotto della norma non sono da considerarsi assolutamente negativi. Di fronte ad un esame seminologico risultato nella norma non è necessario ripetere l'indagine. Qualora lo spermiogramma risultasse alterato è consigliabile ripeterlo una–due volte nei tre mesi successivi. I dati seminologici più importanti nella diagnostica dell'azoospermia sono il volume dell'eiaculato, il pH, la capacità di coagulare e di liquefarsi, la presenza o l'assenza di elementi spermatici maturi o immaturi anche nel *pellet* del centrifugato, l'esame biochimico del plasma seminale. Un basso volume con un pH acido è tipico

Tabella I. Valori normali per il referto dello spermiogramma secondo la WHO (2).

Volume	2.0 mL o più
Concentrazione spermatica	20 milioni/mL o più
Motilità	50% o più con motilità progressiva o, 25% o più con motilità progressiva rapida entro 60 min dall'eiaculato
Morfologia	30% o più forme normali
Leucociti	Inferiori ad 1 milione/mL
Immunobead test	Numero di spermatozoi con particelle adese inferiori al 20%
SpermMar test	Numero di spermatozoi con particelle adese inferiori al 10%

Tabella II. Nomenclatura per il referto dello spermiogramma secondo la WHO (2).

Normozoospermia	Eiaculato normale come da Tabella I
Oligozoospermia	Concentrazione spermatica <20 x 10^6/ mL
Astenozoospemia	Spermatozoi <50% con progessione rapida (categoria a e b) o spermatozoi <25% con categoria a di movimento
Teatozoospermia	Spematozoi <30% con normale morfologia
Oligo-asteno-terato-zoospermia	Alterazione di tutte e tre le variabili
Azoospermia	Assenza di spermatozoi nell'eiaculato
Aspermia	Assenza di eiaculato

dell'assenza congenita dei vasi deferenti (ACVD) e dell'ostruzione dei dotti eiaculatori, ma può anche essere presente nei casi di eiaculazione retrograda e di ipogonadismo ipergonadotropo. Alcuni composti chimici presenti nel plasma seminale vengono dosati routinariamente ed utilizzati in varia combinazione per caratterizzare le forme ostruttive. Il fruttosio è considerato un marker delle vescicole seminali e risulta basso nei soggetti con ACVD. La fosfatasi acida e lo zinco sono marker della prostata, l'L-carnitina dell'epididimo. Il dosaggio di altri marker biochimici come la transferrina, l'α–glucosidasi (marker dell'epididimo, basso nei soggetti con ACVD e nel danno tubulare) o la glicerofosforilcolina è meno utile.
L'analisi computerizzata (CASA) del LS, richiede strumenti costosi e sofisticati che non hanno portato a sostanziali miglioramenti nella diagnosi. L'analisi CASA permette una maggiore accuratezza nello studio della motilità degli spermatozoi e la possibilità di sostituire l'indagine manuale con una valutazione automatizzata, che potrebbe rendere più agevole il lavoro di laboratorio, ma richiede tuttora una standardizzazione dei parametri operativi e dei risultati. Pertanto, questa tecnica deve considerarsi ancora un'applicazione di ricerca.

Test diagnostici di secondo livello

Esami ormonali
Il dosaggio dei livelli delle gonadotropine (FSH ed LH) e del testosterone è utile negli uomini con azoospermia, volume testicolare ridotto e segni di deficit degli androgeni per distinguere l'ipogonadismo primario dal secondario (3). Bassi livelli di LH, FSH e testosterone suggeriscono un ipogonadismo ipogonadotropo (secondario), alti livelli di gonadotropine un ipogonadismo primitivo. Nella diagnostica degli ipogonadismi secondari da patologia ipotalamo-ipofisaria può essere utile il dosaggio della PRL. Un dosaggio complementare può essere quello dell'estradiolo nel sospetto di leydigioma o di patologie sistemiche (epatopatia). Il livello dell'FSH aiuta a distinguere l'ostruzione dai deficit primitivi testicolari nei soggetti con azoospermia, volume testicolare e virilizzazione normali. L'aumento dei livelli di FSH indica sempre un danno importante a livello del tubulo, come dimostrato dagli studi quantitativi delle biopsie testicolari e dal riscontro di livelli elevati di FSH nella maggioranza degli uomini infertili con concentrazione spermatica inferiore a 5 milioni/mL (3). Un ulteriore aiuto nella diagnostica delle testicolopatie primitive può

Tabella III. Principali test di funzione spermatica.

Test	Funzione
Eosin test, swelling test	Integrità membrana, vitalità
Post coital test	Passaggio vie genitali femminili e muco cervicale
Interazione muco-sperma	Sopravvivenza e motilità nel muco cervicale
Slide test	Sopravvivenza e motilità nel muco cervicale
Capacitazione,	Capacitazione
Reazione acrosomiale	Capacitazione
Zona-binding assay	Fertilizzazione ovocita
HOPT (Hamster penetration ovum test)	Fertilizzazione ovocita

essere offerto dall'applicazione su larga scala del dosaggio dell'inibina B, dal momento che attualmente è disponibile una metodica ELISA affidabile. Questa forma di inibina è un prodotto delle cellule del Sertoli, risulta assente negli orchiectomizzati ed ha una reciproca correlazione con i livelli di FSH negli uomini con patologia testicolare e, pertanto, la sua determinazione può essere un marker utile della funzione tubulare nell'uomo (4).

Esame batteriologico
In pazienti con asteno/oligoastenospermia si può sospettare una infezione delle ghiandole sessuali accessorie, qualora all'esame del LS vi sia una viscosità aumentata, pH basico e oltre 1 milione di leucociti/mL. Gli esami batteriologici del LS e delle urine possono essere integrati dall'esame del tampone uretrale e delle urine raccolte dopo massaggio prostatico. Oltre ai coliformi, la *Chlamydia trachomatis*, la *Neisseria Gonorrhoea* e l'*Ureaplasma urealyticum* possono essere responsabili di uretriti, cistiti o epididimiti.

Anticorpi antispermatozoo
In caso di asteno/oligoastenospermia, di LS normale ma con postcoital test negativo o di infertilità inspiegabile si può sospettare una causa autoimmune. Gli spermi sono cellule sequestrate che esprimono numerosi antigeni di superficie, e possono indurre una risposta immune. La formazione di anticorpi antispermatozoo è stata riscontrata in uomini sottoposti a vasectomia, o a traumi testicolari di varia origine (biopsia testicolare, criptorchidismo, cancro testicolare, infiammazione testicolare) (5). La percentuale di soggetti con anticorpi antispermatozoo nella popolazione infertile è tra il 4 e l'11% rispetto alla popolazione fertile (6). Il ruolo degli anticorpi antispermatozoo nell'infertiltà maschile non è del tutto chiaro, ma studi recenti dimostrano che gli anticorpi antispermatozoi diretti contro antigeni della superficie spermatica possono interferire con importanti funzioni come la motilità, la penetrazione nel muco cervicale, la capacitazione e l'interazione spermatozoo-ovocita (5). Gli anticorpi antispermatozoi sono usualmente IgG o IgA. Sebbene entrambi i tipi siano quasi sempre associati, la presenza di sole IgA o di una percentuale di anticorpi adesi superiore al 50% è considerata significativa per una infertilità di natura immunologica. I più comuni test di ricerca degli anticorpi antispermatozoi adesi agli spermatozoi impiegano particelle di latex (MARtest o SpermMARtest) o immunobead di poliacrilamide sensibilizzate per le IgG o le IgA o per entrambe (Tab. I). Questi test diretti possono essere eseguiti durante l'esame del LS di routine (6).

Test diagnostici di livello avanzato

Analisi genetica
Le anomalie cromosomiche si riscontrano con una frequenza dieci volte superiore nei maschi infertili rispetto alla popolazione generale (7). L'analisi del cariotipo va eseguita in tutti i soggetti con azoospermia e severa oligozoospermia e nei casi di aborto ripetuto. Delezioni non visibili al microscopio, o microdelezioni, del braccio lungo della Y sono state trovate associate con una compromissione della spermatogenesi (oligozoospermia severa e azoospermia) (7). La prevalenza di queste alterazioni è stata calcolata tra l'1 ed il 35 % (8% in media) dei soggetti infertili (8). La ricerca di microdelezioni viene raccomandata come un importante stadio diagnostico nelle alterazioni severe della spermatogenesi soprattutto per la valutazione del potenziale rischio di trasmettere l'alterazione a nati da tecniche di fecondazione assistita (9). Tuttavia, l'ampia variabilità della prevalenza delle microdelezioni e l'assenza di chiara correlazione genotipo-fenotipo sminuiscono il significato prognostico di questo esame. Alterazioni geniche di tipo autosomico sono state associate ad infertilità e riguardano il gene deputato alla fibrosi cistica (CFTR). Il 50-70% degli uomini con ACVD ha mutazioni del gene CFTR (7). Uno studio molecolare del gene della fibrosi cistica è importante in tutti i soggetti con agenesia dei deferenti e dovrebbe essere obbligatorio in quelli che siano candidati a prelievo per ICSI (1,7).

Biopsia testicolare
Negli ultimi tempi vi è stata una ripresa d'interesse per la biopsia testicolare, considerata una tecnica diagnostica invasiva, ma utile per la valutazione diagnostica e, soprattutto, prognostica dei soggetti con azoospermia. Poiché le recenti tecniche di micromanipolazione permettono di utilizzare un limitatissimo numero di spermatozoi anche provenienti da prelievo testicolare per la fecondazione *in vitro*, la biopsia consente la definizione della diagnosi ed il recupero dei gameti da utilizzare per l'iniezione intracitoplasmatica. La biopsia testicolare è sicuramente indicata nell'azoospermia con volume testicolare e livelli di FSH normali, in cui si sospetta un'ostruzione. L'indicazione alla biopsia è stata riconsiderata di recente anche nei pazienti con elevazione dell'FSH, nel 50% dei quali la spermatogenesi seppure limitata può essere conservata (10). La biopsia aspirativa con ago per via percutanea è stata proposta come tecnica alternativa in quanto meno invasiva.

Test di funzionalità spermatica
Poiché l'esame standard del LS non è predittivo nei confronti della capacità fecondante degli spermatozoi, sono stati messi a punto dei test che valutano differenti aspetti della funzione spermatica: la vitalità, il passaggio nelle vie genitali femminili, la capacitazione, l'interazione con l'ovocita e la sua penetrazione (Tab. III). Questi test sono diventati molto popolari negli anni '80 proprio per lo sviluppo delle tecniche di inseminazione e di fecondazione assistita. Il post-coital test (PCT) permette una valutazione dell'interazione spermatozoo muco cervicale. Il PCT valuta la penetrazione da parte degli spermatozoi di un seme lique-

fatto nel muco cervicale e la loro sopravvivenza in questo ambiente, dando indicazioni sulla motilità degli spermi e sull'interferenza degli anticorpi o delle caratteristiche fisico-chimiche del muco. Il PCT può aiutare a scegliere una tecnica di inseminazione più appropriata per la coppia. Le tecniche di micromanipolazione hanno ridato importanza ai test di valutazione della vitalità perché possono permettere di distinguere le cellule spermatiche immobili da quelle morte. Altri test utilizzati sono l'*emizona assay* che misura la capacità dello spermatozoo di legare la zona pellucida dell'ovocita umano ed i test di capacitazione e di induzione della reazione acrosomiale, che possono essere predittivi del risultato della fecondazione *in vitro* (1). L'avvento dell'ICSI ha ridotto la richiesta di questi esami sia perché nessuno di essi singolarmente preso sembra predittivo del fallimento della procedura terapeutica, sia perché molte coppie scelgono di sottoporsi al trattamento indipendentemente dalle possibilità pronosticate.

Conclusioni

Lo studio dell'infertilità di coppia richiede una valutazione accurata del partner maschile e femminile. La diagnostica di laboratorio, che deve scaturire dall'inquadramento clinico del paziente (o della coppia), si basa sull'analisi standard del LS e sulla valutazione ormonale, prosegue con esami di secondo e terzo livello, indicati dai risultati dell'approccio iniziale, che, insieme agli esami strumentali possono permettere la definizione eziopatogenetica della condizione e la scelta di idonee terapie.

Bibliografia

1. Forti G, Krausz C. Clinical review 100: evaluation and treatment of the infertile couple. J Clin Endocrinol Metab 1997;83:4177.
2. World Health Organization (WHO). Laboratory manual for the examination of the human ejaculate and sperm-cervical mucus interaction. Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, Mellows HJ, eds. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.
3. de Kretser DM, Baker HWG. Human infertility: the male factor. In: Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z, eds. Reproductive endocrinology, surgery, and technology. Philadelphia-NewYork: Lippincott-Raven, 1996; 2031.
4. Anawalt BA, Bebb RA, Matsumoto AM, et al. Serum inhibin B levels reflect Sertoli cell function in normal men and men with testicular dysfunction. J Clin Endocrinol Metab 1996;81:3341.
5. Hendry WF. The significance of antisperm antibodies: measurement and mamagement. Clin Endocrinol 1992;36:219.
6. Sinisi AA, Di Finizio B, Pasquali D, Scurini C, D'Apuzzo A, Bellastella A. Prevalence of antisperm antibodies by spermmartest in subjects undergoing a routine semen analysis for infertility Int J Androl 1993;16:314.
7. Bhasin Sma K, Sinha I, Limbo M, Taylor WE, Salehian B. The genetic basis of male infertility. Endocrinol Metab Clin North Am 1998;27:783.
8. Foresta C, Moro E, Ferlin A. Y microdeletions and alterations of spermatogenesis. Endocrine Rev 2001;22:226.
9. Simoni M. Molecular diagnosis of Y chromosome microdeletions in Europe: state-of-the-art and quality control. Hum Reprod 2001;16:402.
10. Hauser R, Temple-Smith PD, Southwick GJ, deKretser D. Fertility in cases of hypergonadotropic azoospermia. Fertil Steril 1995;63:631.